IMMUCOR

LIFECODES®

LIFECODES® HLA Typing Tray
Plaque de typage des antigènes HLA
B27 (B27)

REF B27 IVD

CE 0088

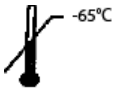

TABLE DES MATIÉRES

INTRODUCTION **2**
COMPOSITION DU COFFRET (SOMMAIRE) **2**
PRINCIPE DU TEST **2**
COMPOSITION DU COFFRET **2**
CONSERVATION ET PRECAUTIONS D'EMPLOI **2**
PRECAUTIONS **2**
ECHANTILLONS **2**
MODE OPERATOIRE **3**
Matériel nécessaire fourni 3
Materiel nécessaire non fourni 3
Procédure 3
CONTROLE QUALITÉ **4**
RESULTATS ET INTERPRETATION **4**
LIMITES DE LA TECHNIQUE **4**
PERFORMANCES **5**
REFERENCES **5**

INTRODUCTION

Les plaques de typage sont utilisées pour déterminer la présence ou l'absence d'antigènes HLA à la surface des lymphocytes en technique de microlymphocytotoxicité complément-dépendante.

COMPOSITION DU COFFRET (SOMMAIRE)

La caractérisation des antigènes HLA B-27 peut être utilisée pour l'évaluation des patients applicable pour les études d'association avec les maladies. Tous les antisérums sont identifiés par des tests sérologiques utilisant des panels de cellules fraîches et congelées connues.

- B27, deux tests par plaque peuvent être exécutés. B27 contient 2 x 22 puits d'antisérums spécifiques d'origine humaine ainsi qu'un contrôle négatif et un contrôle positif. Le contrôle positif, puits 1A et 9A, est un anticorps de lapin anti-lymphocyte humain. Le contrôle négatif, puits 1B et 9B, est un pool de sérum d'hommes sains de groupe AB et non transfusés. Ce puits ne donne aucune réactivité cytotoxique.

PRINCIPE DU TEST

Les lymphocytes viables à tester sont incubés en présence d'antisérums spécifiques et de complément de lapin. Si les antigènes présents à la surface de la cellule correspondent aux anticorps présents dans l'antisérum, il y aura une lyse cellulaire. La mort des cellules sera observée sous microscope à contraste de phase après ajout d'éosine (colorant). La capacité de détection des antigènes de chaque antisérum est précisée sur le tableau d'analyse inclus dans chaque lot de réactif.

Un individu ayant des antigènes de surface HLA-B27 devrait réagir de façon positive avec l'antisérum anti-B27. Quelques antisérums réagissant communément de façon croisée sont inclus et devraient être négatifs à moins que cet individu exprime également un de ces antigènes. Cw1 and Cw2 peuvent être positifs à cause du déséquilibre de la liaison avec B27. Une réaction négative pour Cw1 ou Cw2 n'élimine pas la présence de B27. Des patrons de réactions typiques sont inclus dans le tableau de résultats.

COMPOSITION DU COFFRET

	REF	
▪ Plaque de typage HLA:	B27:403969	44 antisérums plus contrôles.
▪ Complément:	403945	complément de lapin, non toxique pour les lymphocytes normaux. COMP02: 0,5 ml
▪ Huile minérale:		Les antisérums de la plaque sont recouverts d'une huile minérale afin de prévenir l'évaporation.

CONSERVATION ET PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Ne pas diluer de réactifs. Aucune composante du coffret n'a besoin d'être dilué.
- Les plaques et le complément se conservent à une température ≤ -65°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Ne pas utiliser de réactifs ayant passé la date de péremption.
- Décongeler les plaques et le complément à température ambiante pendant 15 minutes et les utiliser dans les 30 minutes suivant le début de la décongélation. Ne pas recongeler.
- Ne pas conserver les plaques dans de la glace sèche une fois le sac hermétique ouvert.

PRECAUTIONS

- Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des plaques a été testé et trouvé négatif concernant les anticorps anti-VIH 1+2, l'hépatite C et l'antigène HBs, mais doit cependant être manipulé comme un produit potentiellement infectieux.
- Certains antisérums présents dans les plaques contiennent 0,1 % d'azide de sodium.
  PRECAUTIONS: L'acide de sodium réagit avec le plomb et le cuivre de la plomberie pour former des métaux acides hautement explosifs. Lorsque l'acide a coulé dans l'évier, il est recommandé de rincer avec beaucoup d'eau pour éviter la concentration d'acide. L'acide de sodium est un poison toxique si ingéré.
- Disposer de toutes les composantes de la trousse selon les règlements locaux.

ECHANTILLONS

Les échantillons de **sang périphérique** prélevés dans de l'héparinate de sodium ou de l'ACD ou bien des cellules ayant été cryopréservées selon une technique acceptable peuvent être utilisés pour ce test.

Prélèvement à l'héparinate de sodium: Prélever 10 ml de sang dans 1000 unités d'héparinate de sodium ou dans un Vacutainer à bouchon vert. Le sang hépariné doit être gardé à température ambiante avant tout isolement des lymphocytes qui doit être effectué rapidement (dans les 24 à 48 heures suivant le prélèvement).
Prélèvement à l'ACD: Le sang ACD doit être gardé à température ambiante avant tout isolement des lymphocytes qui doit être effectué rapidement (dans les 24 à 48 heures suivant le prélèvement).

Une contamination excessive par des plaquettes peut masquer la réaction lymphocytaire ou causer de fausses réactions négatives.

MODE OPERATOIRE

La procédure décrite est le protocole recommendé. L'utilisateur peut établir des variations de la procédure (i.e. fluorescence, temps d'incubation, concentration cellulaire); cependant, l'utilisateur est responsable pour déterminer que ces protocoles sont acceptables avec les plaques de typage des antigènes HLA.

Matériel nécessaire fourni

1. Plaque de typage des antigènes HLA (HLA Typing Tray)
2. Tableaux de résultats (À copier si nécessaire)
3. Tableau d'analyse des antisérums
4. Microtubes de complément de lapin (ABC Complement)

Materiel nécessaire non fourni

1. Sérum de veau foetal à 5%. Dans un milieu de culture de lymphocytes.
2. Seringue de 0,05 ml permettant de distribuer en répétition un volume de 1 µl.
3. Seringue de 0,25 ml permettant de distribuer en répétition un volume de 5 µl.
4. Seringue de 1 ml avec 6 embouts permettant de distribuer en répétition un volume de 3,3 µl.
5. Lamelles (75 x 50 mm).
6. Eosine Y: 5 g pour 100 ml d'HBSS. Filtrer à travers du papier Whatman 1.
7. Formaldéhyde: ajouter 2 ml de rouge de phénol à 0,5 % à 500 ml de formaldéhyde (10 %). Ajuster à pH 7,2 avec de l'acide chlorhydrique concentré.
8. Microscope à contraste de phase.

Procédure

1. Préparer les cellules selon les procédures pour les tests de lymphocytotoxicité établis dans le laboratoire utilisateur.

2. Déterminer si la viabilité cellulaire est acceptable pour le test. La viabilité des lymphocytes doit être au moins de 85%.

3. Ajuster la concentration de cellules à 2×10^6 /ml avec le de sérum foetal à 5%.

4. Sortir la plaque du congélateur et la laisser au moins 15 minutes à la température ambiante; l'utiliser dans les 30 minutes suivant le début de la décongélation.

5. A l'aide de la seringue de 0,05 ml, déposer avec précaution 1 µl d'une suspension de 2×10^6 lymphocytes par ml juste en dessous de l'huile. Assurez-vous que les cellules et les antisérums soient bien mélangés.

6. Incuber la plaque 30 minutes à 20-25°C.

7. A l'aide de la seringue de 0,25 ml, ajouter 5 µl de complément de lapin dans chaque puits.

8. Incuber la plaque 1 heure à 20-25°C.

9. A l'aide de la seringue de 1 ml, ajouter 3,3 µl d'éosine 5 % dans chaque puits.

10. Incuber la plaque 5 minutes à 20-25°C.

11. Ajouter 6,6 µl de solution tamponnée de formaldéhyde dans chaque puits pour arrêter la réaction.

12. Laisser les cellules sédimenter pendant 5-10 minutes avant de couvrir les puits avec une lamelle de 75 x 50 mm.

13. S'ils ne sont pas lues immédiatement, ranger les plaques dans le réfrigérateur avant de les lire pour réduire la formation de bulles.

14. Placer la plaque sur un microscope à contraste de phase et examiner chaque puits. Lire la plaque de gauche à droite et de droite à gauche suivant le schéma du tableau de résultats B27: de 1A à 1F, de 2F à 2A, etc.

15. Noter les réactions observées dans le tableau de résultats B27 fourni.

CONTROLE QUALITÉ

a) Le contrôle positif se trouve dans les puits 1A et 9A pour la plaque B27. Le test est validé s'il y a plus de 51% de cellules mortes par rapport au contrôle négatif.
b) Le contrôle négatif se trouve dans les puits 1B et 9B pour la plaque B27. Les lymphocytes ne doivent pas être détruits par le sérum dans ce puits afin que la limite de viabilité de la préparation lymphocytaire puisse être déterminée par la réaction. La viabilité doit être comprise entre 0 et 20 % pour que le test soit validé. Les autres réactions de la plaque sont enregistrées par l'évaluation de la viabilité en comparaison avec ce contrôle négatif.

RESULTATS ET INTERPRETATION

La lyse cellulaire doit se produire dans les puits pour lesquels l'antigène de surface présent sur les lymphocytes à tester et les anticorps présents dans les antisérums correspondent. En utilisant un microscope à contraste de phase, les cellules vivantes apparaissent brillantes et réfractiles, alors que les cellules mortes peuvent apparaître un peu plus larges et tachées de noir par l'éosine.

L'éosine à la concentration utilisée, est efficace seulement avec un microscope à contraste de phase. Sans ce contraste de phase, les cellules mortes ne peuvent pas apparaître suffisamment noires pour permettre une distinction correcte. Parce que le gonflement des cellules mortes augmente avec l'addition de l'éosine, il est important de permettre au colorant de pénétrer les cellules mortes pendant exactement 5 minutes, avant l'addition du formaldéhyde.

Les résultats sont notés de 1 à 8 suivant le pourcentage de cellules mortes (observées larges, noires et non réfractiles) présentes dans chaque puits.

8 = 81-100 % de cellules mortes
6 = 51-80 % de cellules mortes
4 = 21-50 % de cellules mortes
2 = 11-20 % de cellules mortes
1 = 0-10 % de cellules mortes
0 = non lisible

Suite à l'enregistrement des résultats, comparer les réactions positives aux spécificités contenues dans chaque puits. Les réactions positives se produisent lorsque les antigènes sur les lymphocytes correspondent aux anticorps présents dans les antisérums. Identifier les antigènes présents dans la préparation lymphocytaire testée.

LIMITES DE LA TECHNIQUE

Des résultats erronés peuvent apparaître à plusieurs étapes. Ceux-ci sont rassemblés suivant les étapes du mode opératoire.

a) Identification cellulaire
Lorsque plusieurs échantillons sont testés en même temps, les erreurs suivantes peuvent apparaître pendant l'isolement ou le test:

1. Interchanger les cellules.
2. Tester une cellule 2 fois et en oublier une autre.
3. Mélanger 2 échantillons pendant l'isolement.

b) Isolement cellulaire
La préparation des lymphocytes doit être la plus pure possible. Une contamination cellulaire peut causer les problèmes suivants:

1. Une contamination érythrocytaire peut provoquer une lecture difficile au microscope suite à une confusion avec les lymphocytes. De plus, les érythrocytes peuvent épuiser le complément nécessaire à la réaction lymphocytotoxique.
2. Une contamination plaquettaire peut absorber les anticorps ainsi que le complément, provoquant de fausses réactions négatives.
3. Une contamination granulocytaire peut provoquer de fausses réactions positives dues au phagocytage de l'éosine.
4. La concentration cellulaire est aussi importante car le test est standardisé selon un certain rapport antigène-anticorps. Une concentration cellulaire $< 2 \times 10^6$ lymphocytes / ml peut produire de fausses réactions positives, alors qu'un excès ($>2 \times 10^6$ lymphocytes / ml) peut induire de fausses réactions négatives.

c) Ajout de lymphocytes
Etant donné que l'ajout de lymphocytes dans les puits peut se faire rapidement, plusieurs erreurs peuvent se produire:

1. Erreur dans le mélange des lymphocytes avec les antisérums (cause fréquente de réactions négatives).
2. Saut d'un puits ou d'une rangées de puits.
3. Transport d'un antisérum d'un puits à l'autre avec la seringue.

d) Lecture au microscope
Cette étape est la source principale d'erreurs d'inattention telles que lire la plaque dans le mauvais sens ou encore erreurs lors de l'enregistrements des résultats. Il est essentiel d'avoir un microscope à contraste de phase parfaitement adapté afin de bien différencier les cellules mortes et vivantes.

e) Température
La lymphocytotoxicité est dépendante de la température. Une température de 20-25°C est requise pour effectuer l'analyse.

f) Complément
Le complément de lapin doit être non toxique pour les lymphocytes normaux. Il est recommandé de le manipuler avec précautions. Il doit être complétement décongelé, mélangé (doucement). NE PAS recongeler le complément de lapin.

Une contamination bactérienne des réactifs ou des préparations lymphocytaires peut provoquer de fausses réactions négatives.

PERFORMANCES

Lorsque bien conservée et utilisée selon le mode opératoire décrit ci-dessus, la plaque de typage HLA B27 détectera les antigènes HLA B27.

Des études de reproductibilité ont démontré la présence de moins de 2% de réactions irrégulières. Une comparaison des résultats obtenus avec les plaques de typage HLA et ceux obtenus par la méthode de typage à l'ADN ont démontré une concordance de 97.4%. La sensibilité et la spécificité du produit en lui-même ne peuvent être déterminées; par contre la sensibilité et la spécificité de chaque antisérum inclus dans la plaque sont fournies sur le tableau d'analyse des antisérums. Une réactivité positive correspond à une lyse cellulaire de 50% ou plus causée par les anticorps contenus dans l'antisérum. Les parenthèses indiquent les spécificités pouvant être prises en compte pour une réactivité positive.

La spécificité de chaque antisérum a été confirmée avec un panel de 50 cellules congelées par un laboratoire indépendant, accrédité par "l'American Association of Blood Banks (AABB)" et "l'American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI)" ainsi qu'avec un panel de 75 échantillons frais représentant divers groupes ethniques ou un panel d'environ 125 échantillons frais représentant divers groups ethniques. Le tableau d'analyse des antisérums est un résumé de ces résultats.

REFERENCES

1. Histocompatibility Testing 1980: Report of an International Workshop and Conference, Los Angeles 1980, Ed. Terasaki, P.I., Los Angeles, CA. UCLA Tissue Typing Laboratory, UCLA.
2. Histocompatibility Testing 1984: Report of the Ninth International Histocompatibility Workshop, Munich and Vienna 1984, Eds. Albert, E.D.; Baur, M.P.; Mayr, W.R.
3. Topics in Clinical Histocompatibility Testing: Vol. 1: Schacter, B., Ed. In Chief, 1979 American Association for Clinical Histocompatibility Testing.
4. Manual of Tissue Typing Techniques: (1979) Ed. Ray, J.G., NIAID, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20205. Publ. No. 80-545.
5. Miller, W.V., and Rodey, G: 1981. HLA Without Tears. Chicago: Educational Products Division ASCP.
6. Mittal, K.K.: Standardization of the HLA Typing Methods and Reagents. Vox Sang 34:58-63, 1978.
7. Microdroplet Testing for HLA-A, -B, -C, and –D Antigens. American Journal of Clinical Pathology. Volume 69, Number 2, February 1978, pages 103-120.
8. Rodey, G.E.: 2000. HLA Beyond Tears. 2nd edition. Colorado: De Novo, Inc.

Immucor GTI Diagnostics, Inc.
20925 Crossroads Circle
Waukesha, WI 53186 USA

EC REP
Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Adam-Opel-Strasse 26A
Rodermark 63322
Germany

US and International Contact Information:
Technical Support : waukeshatechsupport@immucor.com

www.immucor.com

© 1985-2015 Immucor GTI Diagnostics, Inc.

303390.IFUFR Rev F
2015-06-01